

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 05004927  
PUBLICATION DATE : 14-01-93

APPLICATION DATE : 28-06-91  
APPLICATION NUMBER : 03158033

APPLICANT : MATSUSHIRO AIZO;

INVENTOR : MATSUSHIRO AIZO;

INT.CL. : A61K 35/74 // A61K 37/54

TITLE : LACTIC ACID-CONTAINING COMPOSITION AND PRODUCTION THEREOF

ABSTRACT : PURPOSE: To provide a composition containing lactic acid bacteria colonized in bacterium floras in human oral cavities and exhibiting a dental caries- preventing effect as well as an intestinal disorder-preventing effect, and further to provide a method for producing the composition.

CONSTITUTION: A composition for foods, drugs, etc., prepared by screening a lactic acid bacterium (preferably Streptococcus salivarius) forming a crater-like colony when cultured under prescribed conditions and producing dextranase, multiplying the screened bacterium, and subsequently compounding the multiplied bacteria, and a method for producing the composition.

COPYRIGHT: (C) JPO

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-4927

(43)公開日 平成5年(1993)1月14日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 K 35/74	ACK A	9165-4C		
// A 6 1 K 37/54		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数9(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平3-158033

(22)出願日 平成3年(1991)6月28日

(71)出願人 591141614

松代 愛三

大阪府吹田市青山台4丁目15番12号

(72)発明者 松代 愛三

大阪府吹田市青山台4丁目15番12号

(74)代理人 弁理士 角田 嘉宏

(54)【発明の名称】 乳酸菌含有組成物及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】 ヒトの口腔内の細菌叢の中に定着している乳酸菌を含有し、整腸効果に加えて虫歯予防効果を奏する組成物およびその製造方法を提供する。

【構成】 所定条件下での培養時にクレーター状のコロニーを形成し、かつデキストラナーゼを産生する乳酸菌(*Streptococcus salivarius*)を選抜する。この選抜した菌株を増殖し、および配合し、調製してなる食品や医薬品等の組成物およびその製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 口腔内に常在し、歯垢分解酵素を産生する乳酸菌を含有することを特徴とする組成物。

【請求項2】 前記乳酸菌が乳酸球菌で、前記歯垢分解酵素がデキストラナーゼである請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記乳酸球菌が、クレーター状のコロニーを形成するストレプトコッカス サリバリウス (*Streptococcus salivarius*) である請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 前記ストレプトコッカス サリバリウスが、*Streptococcus salivarius* M-33 (FERM P-12328) である請求項3に記載の組成物。

【請求項5】 前記ストレプトコッカス サリバリウスが、*Streptococcus salivarius* G8326 (ATCC 7073) である請求項3に記載の組成物。

【請求項6】 口腔内に常在し、デキストラナーゼを産生する乳酸菌を含有することを特徴とする組成物の製造方法であって、下記工程(a)～(d)を含む。すなわち、(a) 口腔内に常在し、歯垢分解酵素を産生する乳酸菌を培地にて培養し、(b) クレーター状のコロニーを形成する菌株を選抜し、(c) 選抜した菌株を増殖し、および(d) 増殖して得られた菌株を配合してなる組成物を調製する。

【請求項7】 前記乳酸菌が、ストレプトコッカス サリバリウス (*Streptococcus salivarius*) である請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】 前記ストレプトコッカス サリバリウスが、*Streptococcus salivarius* M-33 (FERM P-12328) である請求項7に記載の製造方法。

【請求項9】 前記ストレプトコッカス サリバリウスが、*Streptococcus salivarius* G8326 (ATCC 7073) である請求項7に記載の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、乳酸菌を含有する組成物、特に虫歯予防機能と整腸機能を兼ね備えた組成物、およびその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 乳酸菌飲料、乳酸菌を用いたヨーグルト等の食品、および乳酸菌を含有するビオフェルミン（登録商標）等の薬品が、安定した健康食品または医薬品として現在すでに広く一般に普及し、定着している。これら組成物の多くが、*Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, および *Lactobacillus bifidus* 等の乳酸菌を含有しており、そのいずれの組成物も、乳酸菌がヒトの腸内菌叢に到達すれば、到達部位に一時定着する特性を利用して、整腸効果を得ることを特徴としている。

【0003】 本来、ヒトの消化管は口腔にはじまり、胃・腸を経て腔門に至るものであるから、口腔内に常在する有用な細菌を増幅して、腸内細菌によってのみ得られた整腸効果以外の（例えば、虫歯予防の）効果を得ることも充分期待できる。

【0004】 この虫歯予防の観点からは、すでに歯垢の原因となる不溶性グルカン分解するデキストラナーゼおよびグルカナーゼを産生する *Streptococcus sanguis* を遺伝子工学技術を用いて作成することが、特開昭62-25号、特開昭63-185381号、および特開昭63-301788号にて開示されている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者の研究により、ヒトの口腔内の細菌叢の中に定着し、人体に無害な細菌である乳酸球菌の一種の *Streptococcus salivarius* が、強い歯垢分解能力をもつデキストラナーゼを菌体外に産生することを見出したのである。

【0006】 本発明は、この知見を基にして、ヒトの口腔内の細菌叢の中に定着しており、かつ歯垢分解酵素を産生する乳酸菌を単独、もしくは周知の乳酸菌と併せて含有する食品又は薬剤等の組成物を調製して、「整腸効果」に加えて、「虫歯予防効果」という新しい機能を併せ持った組成物およびその製造方法の提供を意図したのである。

【0007】 口腔内に常在する細菌叢は非常に多種類の細菌から構成され、また絶えずその数も消長を繰り返して変化に富んでいる。前記した口腔内に存在する細菌の内、乳酸球菌としては、以下のような菌種の存在が明らかにされている (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2; Williams & Wilkins, 1986, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney)。

【0008】 *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*. 上記した細菌の中で、人体に全く無害で、自ら殆ど歯垢のもとになる不溶性グルカンを産生しないのは、*Streptococcus salivarius* だけである。

【0009】 *Streptococcus salivarius* は、溶性フルクタン (levan) を産生し、また菌株によっては不溶性グルカン (dextran) を産生することが知られている。

【0010】 もし、*Streptococcus salivarius* の中で不溶性グルカンを全く産生せず、逆に不溶性グルカンを分解するデキストラナーゼを産生する株がみつければ、上述した目的を実現するための手段として有用であることは明らかである。

【0011】 そこで、まず、我が国の主な菌株保存施設が保有する菌株リストを調査して、そこから *Streptococcus salivarius* の10株を選抜し、デキストラナーゼ産生

3

や不溶性グルカン産生について検討した。

【0012】

【実施例】

実施例1: Streptococcus salivariusのデキストラナーゼ活性の検討

収集した10株(表1参照)が、Streptococcus salivari\*

4

\*usに属する菌株であることを、1% Chapman Solutionを加えたMITIS-SALIVARIUS AGAR (Difco社製)に播種し、そこで形成されるコロニーの形状(48時間培養)により確認した。

【0013】

【表1】

菌株名	デキストラナーゼ活性*	コロニーの形状**	
		30時間	48時間以後
M-06	+		
M-17	—		
M-33 (FERM P-12328)	+++		
G8326 (ATCC7073)	+++		
13956	+		
HHT	±		
HT9R	±		
HT19	+		
HT32	+		
HT59	+		

\* デキストラナーゼ活性は0.2% Blue Dextranを添加したTodd Hewitt Broth (Difco)寒天平板上でできるHaloの大きさによって判定した。

\*\* コロニーの形状については1%Chapman Solutionを添加したMITIS-SALIVARIUS寒天(Difco)平板上で30時間後及び48時間後にできたコロニーの断面(側面)図として図示した。

【0014】次に、収集した10株を0.2% Blue Dextranを加えたTodd Hewitt Broth (Difco社製)に播種し、2日後にコロニーの周囲にできる透明なハローの大きさから、およそそのデキストラナーゼ産生能力の強弱を判定した。従来、Streptococcus salivariusがデキストラナーゼを産生するか否かについての知見は明確でなかったが、前記表1に示したようにStreptococcus salivariusのデキストラナーゼ産生は、菌株によってまちまちであることが判明した。すなわち、Streptococcus salivarius M-33 (FERM P-12328)及び Streptococcus salivarius G8326 (ATCC7073)などは強力にデキストラナーゼを産生するが、Streptococcus salivarius M-17は全く産生しなかったのである。そして、その他の大部分の菌株はデキストラナーゼを産生するが、その酵素活性は弱かった。

【0015】Streptococcus salivarius M-33は最も強くデキストラナーゼを産生するが、その程度はハロー(halo)の直径から判断して、コントロールに用いたStreptococcus sanguis (pMNK-4)と同レベルであった。次に、Streptococcus salivariusのデキストラナーゼの活※50

※性レベルが、コントロールとほぼ同程度の活性を示したことから、Streptococcus salivarius M-33が歯垢除去のために使用できると判断し、以下の実験を行った。

【0016】実施例2: Streptococcus salivariusの歯垢除去能力の検討

上記したように、Streptococcus salivarius M-33が強力なデキストラナーゼ産生能力を示したので、実際に虫歯菌とStreptococcus salivarius M-33を試験管内で共存させて、歯垢除去能力に関する実験を下記方法に従って行った(図1参照)。

【0017】まず、虫歯菌として用いたStreptococcus sobrinus 6715株をBrain Heart Infusion (Difco社製)培地で18時間、37℃で前培養した。培養液50μlを1%ショ糖を含むBrain Heart Infusion培地3ml中に植え込んだ。培養は図1に示したように13×100mmの試験管(コーニング社製)を30度の傾斜を保って、37℃で静置培養して行った。18時間後に試験管壁に付着した不溶性グルカン(歯垢)の量を図中のA→B→C→Dの順序に従って調べた。下記表2の数値は分光光度計で測定した不溶性グルカンの濁度(550μm)を示す。

【0018】

\* \* 【表2】

培養系	①	②	③	④	Total ⑤	③/⑤ (loose)	④/⑤ (firm)	③+④ ⑤
6715 単独	0	0.0108	0.257	0.734	1.002	24.90	74.04	98.94
6715 M-33	0.26	0.27	0.91	0.50	1.93	47.36	25.72	73.08
6715 G8326	0.36	0.18	0.54	0.72	1.80	30.02	40.61	70.63

【0019】前記表2中の①②で測定された不溶性グルカンは、「ゆすぎ」(rinse) で得られるもので歯垢といえるものではない。また、③は「渦巻き攪拌」(vortex) で得られるゆるく結合した歯垢で「loose」と称する。さらに、④は超音波処理(1分)によってはじめて得られる歯垢部分で「firm」と称する。

【0020】*Streptococcus sobrinus* 6715 (虫歯菌) のみを用いた実験で形成される歯垢の量を示す前記表2の実験結果は、*Streptococcus sobrinus* 6715 単独では強固に結合した「firm」の歯垢が大部分を占めることを示している。

【0021】次に、*Streptococcus sobrinus* 6715 と *Streptococcus salivarius* M-33 を共存させて培養した場合について検討を行った。この場合、前培養した *Streptococcus salivarius* M-33 の 50  $\mu$ l と *Streptococcus sobrinus* 6715 の 50  $\mu$ l を植え込んだものを、対照と同じ条件で培養、処理して歯垢の量を測定した。前記表2に示すように、この場合の歯垢は「ゆすぎ」で得られるものや、渦巻き攪拌して得られる「loose」の歯垢が多く、逆に強固に結合した「firm」の歯垢は減少していることが認められた。同様な傾向は、虫歯菌と *Streptococcus salivarius* G8326 を共存させた実験でも再現された。

【0022】以上の結果から、デキストラナーゼを強く産生する *Streptococcus salivarius* M-33 もしくは *Streptococcus salivarius* G8326 を虫歯菌と共存して培養すると、「firm」の歯垢は減少して「loose」な歯垢が増加することが判明した。すなわち、この結果から、デキストラナーゼを強力に産生する *Streptococcus salivarius* M-33 もしくは *Streptococcus salivarius* G8326 を虫歯菌と共存して培養した場合、歯垢は産生されるものの、歯垢を構成するグルカンの  $\alpha$ -1,6 結合が、デキストラナーゼの作用を受けて切断されて、もろくて除去されやすくなったグルカンが増えたものと考えられる。

【0023】実施例3: *Streptococcus salivarius* のデキストラナーゼ産生能力の程度とコロニーの形態との関係

上記実施例1および2の結果から、*Streptococcus salivarius* の中でデキストラナーゼを強力に産生する菌株 ※50

※が、歯垢を分解除去する上で効果があることが判明したわけである。そこで、このような性質を有する *Streptococcus salivarius* の sub-group を特定するために、下記試験をさらに実施した。

【0024】実施例1で用いた1% Chapman Solution を添加した MITIS-SALIVARIUS 寒天(Difco社製)の平板に *Streptococcus salivarius* の各株を播種して37℃に保温すると、約30時間後には表1右欄に示したように、大多数の株は典型的な大きなスムーズ(Smooth)コロニーに生長した。更に培養を続けて、48時間以上経過すると、M-33やG8326などのデキストラナーゼを強く産生する菌株はコロニーの中心が落ち込んできて、次第に、いわゆるクレーター状になった。デキストラナーゼ活性が弱い菌株ではこのような変化は認められなかった。なお、デキストラナーゼを産生しない菌株のコロニーは、上記した菌株の場合とは異なり、非典型的なラフ(Rough)型のコロニーになる。

【0025】すなわち、上記実験結果より、*Streptococcus salivarius* の中で、デキストラナーゼを強力に産生する菌株は MITIS-SALIVARIUS 寒天平板上に播種し、48時間以上培養した場合、そのコロニーの形状がクレーター状になるという事実から、デキストラナーゼ産生能力とコロニーの形状との関連づけができたのである。

【0026】上述したようなデキストラナーゼ産生能力の強弱とコロニーの形態の関係は、以下に述べる根拠から容易に理解できる。すなわち、*Streptococcus salivarius* は一般に、菌体外多糖類として水に溶けやすいフルクタン(levan)と水に難溶性のグルカン(dextrans)を産生する。そして、細胞の増殖と共に多糖が産生されるので、そのコロニーはこんもりと盛り上がり、光沢のあるスムーズ(Smooth)な形状を生成するものと考えられる。また、表1左欄より、*Streptococcus salivarius* の多くの菌株のデキストラナーゼ産生能力は強くないので、培養を長く続けても dextrans は殆ど分解されず、コロニーの形状は変化しない。これに対して、デキストラナーゼを強力に産生する *Streptococcus salivarius* M-33 や *Streptococcus salivarius* G8326 では、初めはスムーズなコロニーになるが、培養時間が長引くと、コロニ

7

一の中心部分では細胞の増殖が止まる一方でdextransの分解が進むので、クレーター状のコロニーが形成されることが考えられる。

【0027】

【発明の効果】本発明によって、不溶性グルカンを殆ど産生せず、しかも不溶性グルカンを分解するデキストラナーゼを産生するStreptococcus salivarius菌が検索され、またデキストラナーゼ活性の強いStreptococcus

8

salivarius菌とその菌株が形成するコロニーとの相関関係が認識されるに至り、今後の研究における大きな手がかりを提供したのである。さらに、本発明は周知の「整腸効果」に加えて、「虫歯予防効果」という新しい機能を併せ持った、乳酸菌を含有する食品又は薬剤等の組成物の提供を可能にしたのである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の歯垢除去能力検査の工程図。

【図1】

